植物源物质诱导的斜纹夜蛾细胞凋亡

钟国华，水克娟，黄劲飞，贾建文，胡美英*

（华南农业大学昆虫毒理研究室，农药与化学生物学教育部重点实验室，广州 510642）

摘要：为了研究植物源物质对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 离体培养细胞系 SL-1 的凋亡诱导作用，采用倒置相差显微镜观察了印楝素、喜树碱等 9 种物质各自对 SL-1 凋亡小体的浓度效应及时序性。结果表明：印楝素 0.1～5.0 μg/mL 和喜树碱 0.5～20.0 μmol/L 处理 SL-1，24～48 h 后均产生大量典型的凋亡小体；茶皂素、蓖麻碱、黄樟油、丹皮酚、烟碱、苦参碱和博落回碱 0.1～20.0 μg/mL 处理 SL-1 后，整个观察期 72 h 内均无明显凋亡小体出现，凋亡诱导作用不明显。印楝素 0.75 μg/mL 诱导 SL-1 细胞凋亡，从凋亡小体判断，处理后 0～36 h 属细胞凋亡早期，36～60 h 属细胞凋亡中期，60 h 后为细胞凋亡晚期。喜树碱 5.0 μmol/L 诱导 SL-1 细胞凋亡，处理后 0～24 h 属细胞凋亡前期，24～54 h 属细胞凋亡中期，54 h 后进入细胞凋亡晚期。初步认为印楝素和喜树碱对 SL-1 有凋亡诱导作用，并具有一定的浓度依赖性和时序性。

关键词：细胞凋亡；植物源物质；凋亡小体；印楝素；喜树碱；斜纹夜蛾细胞系 SL-1

中图分类号：S482.39　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2008)04-0449-05

Induction of apoptosis by botanical components in *Spodoptera litura* cultured cell line

ZHONG Guo-Hua，SHUI Ke-Juan，HUANG Jin-Fei，JIA Jian-Wen，HU Mei-Ying* (Laboratory of Insect Toxicology，Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology，Ministry of Education，People's Republic of China，South China Agricultural University，Guangzhou 510642，China)

Abstract：In order to determine the apoptotic inductivity of botanical components to *Spodoptera litura* cultured cell line SL-1，the concentration and time dependence of apoptotic-induce ability of nine botanical components，including azadirachtin and comptothecin，to SL-1 was investigated by inverted phase contrast microscope. The results showed that a great deal of apoptotic bodies appeared，one of the typical morphological characteristics of apoptosis，24－48 h after treatments with azadirachtin at a concentration of 0.1－5.0 μg/mL and comptothecin at 0.5－20.0 μmol/L；the same changes，however，did not appear in SL-1 cells within the whole observation period of 72 h after treatments with tea saponin，ricinine，sassafras，paeonolum，nicotine，matrine and macleay cordata at concentrations of 0.5－20 μg/mL. Treated by azadirachtin at a concentration of 0.75 μg/mL，the early，mid and late apoptotic stages apoptosis of SL-1 cells appeared during 0－36 h，36－60 h and 60 h after treatment，respectively；and treated by comptochetin at a concentration of 5.0 μmol/L，these appeared during 0－24 h，24－52 h and 54 h after treament，respectively. It is tentatively concluded that azadirachtin and camptothecin both possess the concentration-time-dependence induction of apoptosis to SL-1 cells.

Key words：Apoptosis；botanical components；apoptotic bodies；azadirachtin；camptothecin；*Spodoptera litura* cultured cell line SL-1

基金项目：国家自然科学基金项目(30500335)；教育部全国优秀博士学位论文作者专项基金(2004061)

作者简介：钟国华，男，博士，副教授，主要研究方向为天然源农药、昆虫生理毒理及昆虫细胞生物学，Tel.：020-85280308；E-mail：guohuazhong@scau.edu.cn；guohuazhong@tom.com

* **通讯作者** Author for correspondence，E-mail：humy@scau.edu.cn

收稿日期 Received：2007-10-17；**接受日期** Accepted：2008-03-05

细胞凋亡(apoptosis)是多细胞生物在机体生长发育、细胞分化和病理状态中基因调控的细胞主动性死亡的过程和状态,是细胞的基本生命现象,其发生对机体维持稳态和正常生理功能至关重要(White *et al*., 1994;彭黎明和王曾礼,2000)。细胞凋亡研究对于揭示生命活动规律具有重大科学意义,对于寻找新型高效低毒的活性化合物亦具有重要的实践指导价值(Landis-Piwowar *et al*., 2006;Loh *et al*., 2006;Colgate *et al*., 2007)。近年来,为了寻找害虫控制新技术,建立新型高效快速筛选体系,深入研究活性物质作用机制,国内外关于各种内源和外源物质对昆虫细胞活性研究渐多(Luo and Pang, 2006;Ffrench-Constant *et al*., 2007;Coppet *et al*., 2007;Liu *et al*., 2007)。Rahioui 等(2007)报道了豌豆蛋白 PA1b 对草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 离体培养细胞系 Sf-9 的细胞毒性,并且观察到可能有细胞凋亡诱导作用。从黄杜鹃中分离的四环二萜类化合物 rhodojaponin III、rhodomolins A 和 B 对 Sf-9 均有不同程度的细胞毒性(Zhong *et al*., 2005)。Rembold 等(1993)报道从印楝中分离的四环三萜类化合物印楝素(azadirachtin)通过抑制细胞增殖和蛋白质合成导致 Sf-9 死亡。Cohen 等(1996)报道了楝科植物多种柠檬素类(limonoids)化合物对 Sf-9 的毒杀活性,而 Salehzadeh 等(2002,2003)利用 MTT 法测定结果表明,印楝素以 5×10^{-6} mol/L 处理 2 h 后 Sf-9 细胞有丝分裂指数达到最大值,处理后 20 h 后处于 G_2/M 期细胞达 90%,处理后 96 h 对 Sf-9 抑制增殖有效中浓度(EC_{50})为 1.5×10^{-10} mol/L。Anuradha 等(2007)研究认为印楝素作用于 Sf-9 的靶标可能是细胞骨架的肌动蛋白。本文研究报道了印楝素、喜树碱、烟碱等 9 种植物源物质对斜纹夜蛾离体培养细胞系 SL-1 细胞凋亡小体的影响,旨在为筛选新型作用机制的生物合理农药、研究高效植物源物质杀虫作用机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 供试细胞及培养

供试昆虫细胞为斜纹夜蛾 *Spodotera litura* SL-1 细胞系,由本室采用常规方法培养供试。细胞培养所用培养基为 Grace's 昆虫干粉培养基(Gibco 公司),热灭活胎牛血清(FBS,Gibco 公司)。

1.2 供试化合物

印楝素(99.00%, azadirachtin),Sigma 公司;喜树碱(99.64%, camptothecin),四川锶全天然产物有限公司;蓖麻碱(99%, ricinine),广州大学郑诚教授提供;烟碱(90%, nicotine),陕西天则生物技术有限责任公司惠赠;苦参碱(>98%, matrine)、丹皮酚(>98%, paeonolum),均由西安中鑫生物技术有限公司惠赠;茶皂素(tea saponin, >80%)、黄樟油(sassafras, >90%)、博落回碱(macleay cordata, >95%)均由本课题组分离提纯供试。

1.3 细胞凋亡小体检测

形态学变化是判断凋亡最直接的依据,其中凋亡小体的出现为初步判断凋亡与否的最核心依据(彭黎明和王曾礼,2000)。将适量印楝素等上述 9 种供试药剂溶于 DMSO 中制备 1 000 倍终浓度的贮存液,取 10 μL 溶于 990 μL 含 10% FBS 昆虫细胞完全培养液中即为 10 倍终浓度的工作液。对照(CK)为 1% DMSO 溶液。培养细胞生长至 70%~80% 汇合时吸出全部条件培养液并加入新鲜培养液,24 h 后细胞处于对数生长期时在条件培养液中加入供试化合物药剂的 10 倍终浓度工作液。混匀后在倒置显微镜(Olympus 公司,观察倍数目镜 10× 物镜 20)下观察 72 h,记录细胞形态学变化。在预试验基础上,确定印楝素供试浓度为 0.1,0.5,0.75,1.5,5.0 μg/mL,喜树碱为 0.5,1.0,5.0,10.0,20.0 μmol/L 等 5 个浓度,其他药剂供试浓度为 0.1,0.5,1.0,5.0,10.0,20.0 μg/mL 等 6 个浓度。经过初筛初步判断能够诱导产生大量凋亡小体的典型物质。以凋亡小体诱导效果和苔盼蓝染色结果作为主要考虑因素,选择使细胞凋亡率较高,而死亡率较低的适宜浓度处理,进一步研究典型物质诱导昆虫细胞凋亡的时序性。

2 结果与分析

2.1 印楝素对 SL-1 的细胞凋亡诱导作用

CK 细胞以终浓度 1.0% 的 DMSO 处理后 96 h 内,细胞呈梭形贴壁生长,细胞核均匀居于细胞质中央,细胞界限清晰,增殖正常(图 1:A)。以倒置相差显微镜观察,印楝素以终浓度 0.1,0.5,0.75,1.5,5.0 μg/mL 处理 SL-1 后 1~2 h 后均即可见细胞皱缩成圆形球状,贴壁松散,只有极少数细胞保持原有正常形态;处理后 36 h 可观察到细胞核偏移,细胞皱缩,与 CK 相比,但凋亡小体数量无明显增多。处理后 48 h 各浓度处理细胞体进一步皱缩,细胞间隙略增大,细胞核偏移,细胞内可见空泡结构,出现大量

凋亡小体，凋亡小体随浓度的增加而增多（图 1：B ~ E），呈现细胞凋亡典型形态学特征，初步认为对 SL-1 具有细胞凋亡诱导作用。以供试最高浓度 5.0 μg/mL 处理 SL-1 细胞凋亡小体数量虽然高于 CK，但低于其他浓度处理，漂浮细胞量大幅升高，说明致细胞死亡（图 1：F）。各处理 60 h 和 72 h 结果与 48 h 相比变化不明显。对以上各浓度印楝素诱导处理 SL-1 后的贴壁和飘浮细胞进行苔盼蓝染色，除极少数细胞外，绝大多数细胞拒染，说明细胞膜完整。

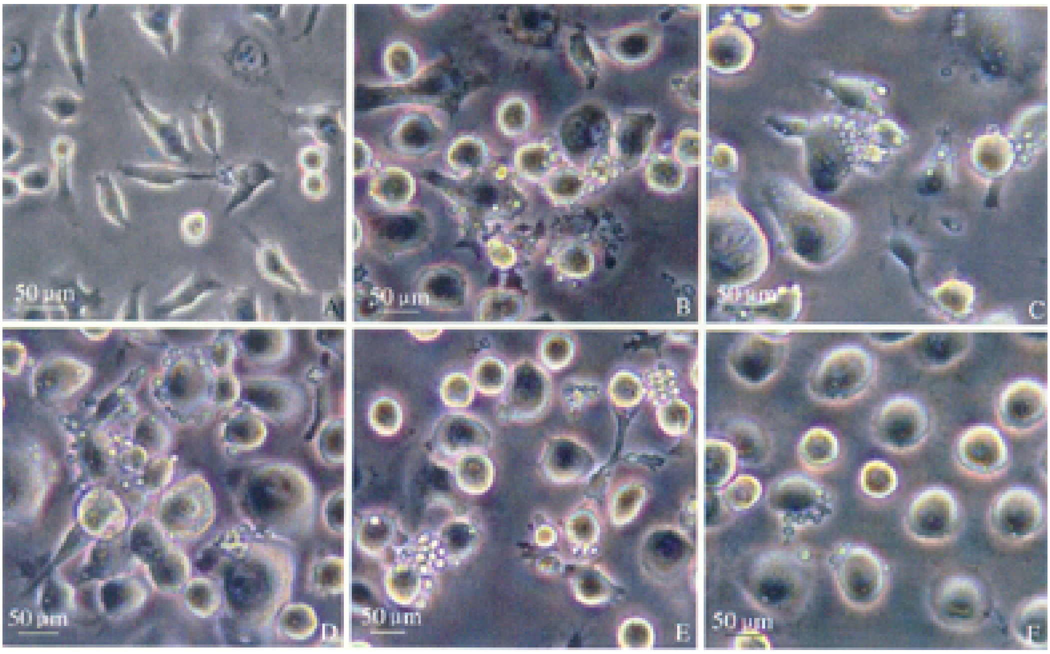

图 1　印楝素不同浓度诱导 SL-1 细胞凋亡的细胞形态变化

Fig. 1　Morphological changes of SL-1 cells apoptosis induced by azadirachtin with different concentration

A：0 h（CK）；B：0.1 μg/mL，48 h；C：0.5 μg/mL，48 h；D：0.75 μg/mL，48 h；E：1.5 μg/mL，48 h；F：5.0 μg/mL，48 h；

2.2　喜树碱对 SL-1 的细胞凋亡诱导作用

喜树碱 0.5 μmol/L 处理 SL-1 后 12 ~ 48 h，细胞形态未发生明显变化，与 CK（图 2：A）无明显区别，直至 60 h 细胞核发生明显偏移，部分细胞有出泡现象和较少凋亡小体（图 2：B）；以 1.0 μmol/L 处理 24 h 即可观察到细胞皱缩、细胞核偏移、出泡或核膜界限模糊现象，48 h 后可见凋亡小体（图 2：C）；以 5.0 μmol/L 处理后 24 h 即可见明显的凋亡小体，处理后 48 h 多数凋亡小体出现，分散在正常形态细胞周围或扩散分布在培养液中（图 2：D）；以 10 μmol/L 和 20 μmol/L 处理 24 h 后，可见部分细胞皱缩，细胞核偏移，48 h 可见凋亡小体（图 2：E，F），初步认为喜树碱能诱导 SL-1 细胞凋亡。随着喜树碱处理浓度提高，坏死细胞明显增加，形态特征为细胞边际模糊破碎，细胞漂浮。苔盼蓝染色结果表明，喜树碱以 0.5，1.0，5.0 μmol/L 处理的多数细胞拒染，而以 10，20 μmol/L 处理时，染色细胞比例显著高于前 3 个浓度处理，说明坏死细胞比例较高。除 CK 外，各处理均无细胞增殖。

2.3　茶皂素、蓖麻碱等 7 种植物源物质对 SL-1 的影响

茶皂素、蓖麻碱、黄樟油、丹皮酚、烟碱、苦参碱、博落回碱等 7 种植物源物质以 0.5，5.0，20.0 μg/mL 处理后 72 h 内，除细胞个体比 CK 略有增大外，无凋亡小体等细胞凋亡典型特征，细胞核等形态学特征与 CK 无显著差异，均可见正常分裂相，各浓度处理 SL-1 细胞正常贴壁且均对苔盼蓝拒染，说明细胞生长和活力正常，在供试浓度和时间范围内没有诱导 SL-1 细胞凋亡。各处理细胞数量与 CK 相当，处理后 72 h 内无明显增殖。

2.4　印楝素对 SL-1 细胞凋亡诱导作用的时序性

印楝素 0.75 μg/mL 处理后 2 h 即可见绝大部分细胞皱缩成圆形，极少数保持正常梭形，处理后 24 h 细胞外部形态与处理后 2 h 相比变化不明显，细胞间隔略有增大，细胞核明显偏移。处理后 30 h，处理细胞间隔增大，细胞核偏移程度进一步扩大。处理

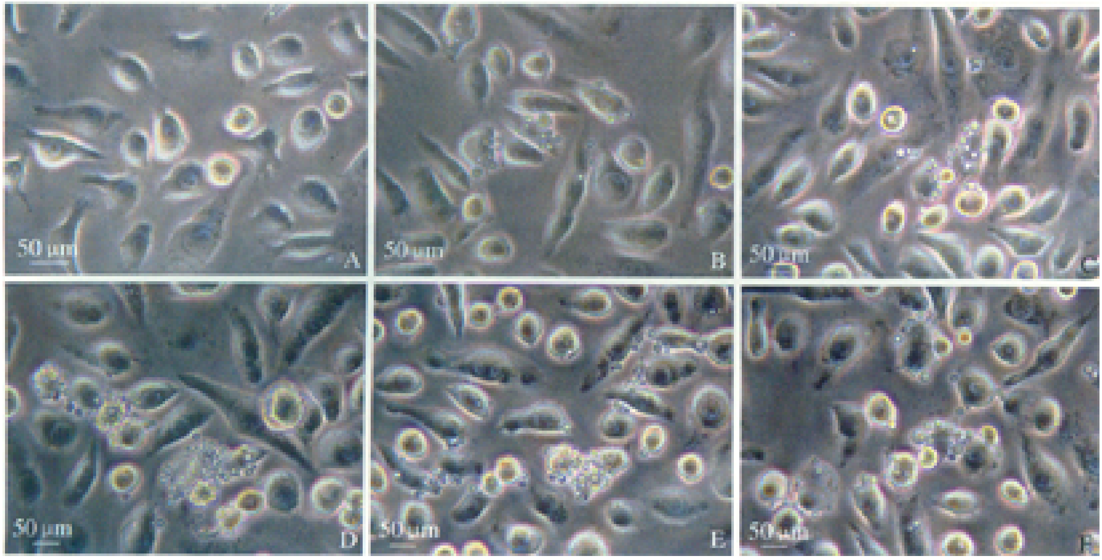

图 2 喜树碱不同浓度诱导 SL-1 细胞凋亡的细胞形态变化

Fig. 2 Morphological changes of SL-1 cells apoptosis induced by camptothecin with different concentration

A: 0 h (CK); B: 0.5 μmol/L, 48 h; C: 1.0 μmol/L, 48 h; D: 5.0 μmol/L, 48 h; E: 10.0 μmol/L, 48 h; F: 20.0 μmol/L, 48 h.

后 36 h，可见少量凋亡小体聚集在细胞周围，此时细胞形态基本保持正常。处理后 42，48，60 h，细胞皱缩并对苔盼蓝拒染，凋亡小体数量逐渐增多，细胞凋亡形态特征典型。处理后 72 h，凋亡小体数量与 60 h 相比有所减少。据此可初步判断印楝素 0.75 μg/mL 诱导 SL-1 细胞凋亡，典型形态学改变始于处理后 36 h，以此为分界点，之前属于细胞凋亡早期，36 ~ 60 h 属于细胞凋亡中期，此时凋亡小体数量最多，是倒置显微镜形态学特征最为典型观察时间。60 h 后为细胞凋亡晚期，正常形态细胞吞噬凋亡小体。

2.5 喜树碱对 SL-1 细胞凋亡诱导作用的时序性

以 5.0 μmol/L 作为适宜诱导浓度，处理后 4 h 仅有部分细胞有出现皱缩，与 CK 形态学变化差异不明显。处理后 24 h 细胞间隔增大，细胞核偏移，可见少量凋亡小体。处理后 30 ~ 54 h 聚集凋亡小体数量不断增多并逐渐扩散，54 h 凋亡小体数量最多。处理后 60 h 凋亡小体数量略有减少，可见细胞内空泡结构等现象。以上结果说明喜树碱 5.0 μmol/L 诱导 SL-1 细胞凋亡典型形态特征出现在处理后 24 h，此前属于细胞凋亡前期，处理后 24 ~ 54 h 属细胞凋亡中期，54 h 是细胞凋亡倒置相差显微镜形态学特征最典型的观察时间，凋亡小体数量最多，60 h 后进入细胞凋亡晚期。

3 讨论

细胞凋亡是生物体固有的生命现象，能够显著加速或延缓细胞凋亡的化合物都可能开发成新药物（Zhang *et al*., 2004；Stephen，2005；Magedov *et al*., 2007；Shi and Li，2007）。利用高效天然产物诱导昆虫细胞凋亡，或者从中发现先导化合物简化结构，可能开发出新农药。本文对印楝素、喜树碱等 9 种植物源物质的研究结果表明，印楝素 0.1 ~ 5.0 μg/mL 和喜树碱 0.5 ~ 20.0 μmol/L 处理整个观察期 72 h 以内，出现大量凋亡小体，可明显诱导 SL-1 细胞产生凋亡典型形态学特征，初步判断在供试条件下可诱导 SL-1 细胞凋亡，且两者的细胞凋亡诱导作用形态学变化具有一定相似性，均由细胞皱缩、核偏移和细胞间隔增大等现象开始变化，随后凋亡小体数量不断增多并扩散分布，最后进入凋亡晚期。茶皂素、蓖麻碱、黄樟油、丹皮酚、烟碱、苦参碱、博落回碱 0.1 ~ 20.0 μg/mL 处理后整个观察期 72 h 内，对 SL-1 细胞毒力不大，细胞继续分裂生长，略有肿胀但贴壁形态不发生明显变化，未出现凋亡小体等典型形态学特征。由于正常离体培养细胞中可能存在一定程度的细胞凋亡，仅通过倒置显微镜检测细胞凋亡小体判断是否是由外源诱导因子引起的细胞凋亡不够完整，仅能作为初步判断的依据，仍然需要结合其他方法进一步检测说明，如 DNA ladder 检测，荧光显微镜 DAPI 染色，及流式细胞仪凋亡率等指标测定（Philpott *et al*., 1996；彭黎明和王曾礼，2000；Van Cruchten and Van den Broeck，2002），同时对于不同药物对 SL-1 细胞发生作用的机理方面还需要进一步研究。

参 考 文 献（References）

Anuradha A，Annadurai RS，Shashidhara LS，2007. Actin cytoskeleton as a putative target of the neem limonoid Azadirachtin A. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*，37(6)：627 – 634.

Cohen E，Quistad GB，Casida JE，1996. Cytotoxicity of nimbolide，epoxyazadiradione and other limonoids from neem insecticide. *Life Sciences*，58(13)：1 075 – 1 081.

Colgate EC，Miranda CL，Stevens JF，Bray TM，Ho E，2007. Xanthohumol，a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer Letters*，246(1 – 2)：201 – 209.

Cooper DM，Pio F，Thi EP，Theilmann D，Lowenberger C，2007. Characterization of *Aedes* Dredd：A novel initiator caspase from the yellow fever mosquito，*Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*，37(6)：559 – 569.

Ffrench-Constant RH，Dowling A，Waterfield NR，2007. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon*，49(4)：436 – 451.

Landis-Piwowar KR，Milacic V，Chen D，Yang HJ，Zhao YF，Chan TH，Yan B，Dou QP，2006. The proteasome as a potential target for novel anticancer drugs and chemosensitizers. *Drug Resistance Updates*，9(6)：263 – 273.

Liu LJ，Peng JX，Liu KY，Yang H，Li Y，Hong HZ，2007. Influence of cytochrome c on apoptosis induced by *Anagrapha* (*Syngrapha*) *falcifera* multiple nuclear polyhedrosis virus in insect *Spodoptera litura* cells. *Cell Biology International*，31(9)：996 – 1 001.

Loh KP，Low LS，Wong WH，Zhou S，Huang SH，De Silva R，Duan W，Chou WH，Zhu YZ，2006. A comparison study of cerebral protection using *Ginkgo biloba* extract and Losartan on stroked rats. *Neuroscience Letters*，398(1 2)：28 – 33.

Luo KJ，Pang Y，2006. *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus inhibits *Microplitis bicoloratus* polydnavirus-induced host granulocytes apoptosis. *Journal of Insect Physiology*，52(8)：795 – 806.

Magedov IV，Manpadi M，Rozhkova E，Przheval'skii NM，Rogelj S，Shors ST，Steelant WFA，Van Slambrouck S，Kornienko A，2007. Structural simplification of bioactive natural products with multicomponent synthesis：Dihydropyridopyrazole analogues of podophyllotoxin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*，17(5)：1 381 – 1 385.

Peng LM，Wang ZL，2000. The Basics and Clinics of Apoptosis. People's Medical Publishing House，Beijing. 1 – 9，153 – 218. [彭黎明，王曾礼，2000. 细胞凋亡的基础与临床. 北京：人民卫生出版社. 1 – 9，153 – 218]

Philpott KL，McCarthy MJ，Becker D，Gatchalian C，Rubin LL，1996. Morphological and biochemical changes in neurons：apoptosis versus mitosis. *European Journal of Neuroscience*，8(9)：1 906 – 1 915.

Rahioui I，Laugier C，Balmand S，DaSilva P，Rahbe Y，Gressent F，2007. Toxicity，binding and internalization of the pea-A1b entomotoxin in Sf9 cells. *Biochimie*，89(9)：1 – 5.

Remnold H，Annadurai RS，1993. Azadirachtin inhibits proliferation of sf-9 cells in monolayer-culture. *J. Biosciences*，48(5 – 6)：495 – 499

Salehzadeh A，Akhkha A，Cushley W，Adams RL，Kusel JR，Strang RH，2003. The antimitotic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，33：681 – 689.

Salehzadeh A，Jabbar A，Jennens L，Ley SV，Annadurai RS，Adams R，Strang RHC，2002. The effects of phytochemical pesticides on the growth of cultured invertebrate and vertebrate cells. *Pest Management Science*，58：268 – 276.

Shi YL，Li MF，2007. Biological effects of toosendanin，a triterpenoid extracted from Chinese traditional medicine. *Progress in Neurobiology*，82(1)：1 – 10.

Stephen WF，2005. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer*，5(12)：995.

White K，Grether ME，Abrams JM，Young L，Farrell K，Steller H，1994. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science*，264：677 – 683.

Van Cruchten S，Van den Broeck W，2002. Morphological and biochemical aspects of apoptosis，oncosis and necrosis. *Journal of Veterinary Medicine Series C*，31 (4)：214 – 223.

Zhang HZ，Kasibhatla S，Wang Y，Herich J，Guastella J，Tseng B，Drewe J，Cai SX，2004. Discovery，characterization and SAR of gambogic acid as a potent apoptosis inducer by a HTS assay. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*，12(2)：309 – 317.

Zhong GH，Hu MY，Wei XY，Weng QF，Xie JJ，Liu JX，Wang WX，2005. Grayanane diterpenoids from the flowers of *Rhododendron molle* with cytotoxic activity against a *Spodoptera frugiperda* cell line. *Journal of Natural Products*，68(6)：924 – 926.

（责任编辑：黄玲巧）